

# 连续通过粘虫虫体传代对苏云金杆菌晶体形成的影响

幸兴球 谢强江 杨明华

(中国科学院动物研究所)

史泰奥斯 (1966) 曾指出, 昆虫病原微生物连续通过敏感寄生可以提高病原的毒性, 吉川等 (1974) 将苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis* Berl.) 的一个菌株通过斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 作传代试验 (不是连续传代, 中间经过平板分离), 发现经过 6 次传代后细菌在虫尸内增殖良好。在我国, 一般也认为通过虫体传代可以恢复或提高毒力, 即所谓“虫体复壮” (盛祖嘉, 1974)。我们试图用这个方法得到对粘虫 (*Leucania separata* Wal.) 毒力强的菌株。但发现所有试验的 6 个菌株, 在经过 10 到 14 次传代之后都相继失去了产生晶体的能力。在将要失去产生晶体能力之前的几代, 一些菌株晶体大小发生变化, 从中分离到一个对粘虫毒力较强的菌株——IIA9<sub>(%)</sub> 株。

本文报告这一传代试验及其结果。

## 材料和方法

(一) 供传代的苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 下略为 *B. t.*) 菌株

科 010 株——本所昆虫病理组保存 (昆虫病理组, 1973)。

C<sub>1</sub> 株——从美国商品 Dipel 粉剂中分离的培养物。

E013 株——从英国引进的菌株 (var. *soluorshi*), 本所昆虫病理组保存。

IIA9 株、IIA29 株和 IIAW1 株——为 E013 株经紫外线处理后获得的变异株。使用的紫外灯波长 2537 Å, 距离 35 厘米, 照射 4 分钟。细菌为肉汤振荡培养 10 小时并经水洗的营养体。

## (二) 培养基

1. 普通肉汤琼脂培养基——蛋白胨 1.0%, 牛肉膏 0.5%, 琼脂 2.0% (供菌种保存和平板分离用)。

2. 三角瓶液体培养基——豆饼粉 2.4%, 玉米粉 1.0%, 玉米浆 2.0%, CaCO<sub>3</sub> 0.1% (供毒力试验用)。

## (三) 虫体传代

传代的菌株斜面菌苔小半环在 1 毫升 0.1% 洗衣粉水中制成悬液, 将小麦叶片或玉米叶片 3—4 片浸入, 取出放入有滤纸的培养皿中凉干, 每皿放入 4—6 条 5—6 龄粘虫幼虫, 30℃ 保温饲养一天后, 将幼虫用 0.1% 升汞水体表灭菌, 再投入热开水中杀死, 取出放入有滤纸的灭菌培养皿中。为了防止虫尸干燥, 皿中加一小块无菌水湿棉球, 继续保温 2—3 天后, 取虫尸中段体液镜检, 芽孢、晶体形成者用镊子取出并用 70% 酒精进行体表灭菌, 将虫尸放入装有约 1 毫升 0.1% 无菌洗衣粉水的试管中捣碎, 以此作为菌悬液再反复进行传代。

## (四) 毒力试验

1. 细菌培养 将液体培养基分装入 500 毫升三角瓶内, 每瓶 30 毫升, 1.1 公斤/厘米<sup>2</sup> 灭菌 30 分钟。接种后, 30℃ 摇床振荡培养直到芽孢晶体形成。

2. 毒力测定方法 将摇床培养的菌液 (约每毫升 35—40 亿芽孢) 用 0.1% 洗衣粉水稀释 20 倍 (每毫升约为 1.5—2.0 亿芽孢)。将可供 3 天食用的玉米叶剪成 8—9 厘米一段, 浸入菌悬液中, 取出凉干, 每罐头瓶内放入玉米叶 5—6 片及 20 条 4 龄第一天的幼虫, 两个重复, 29℃ ± 1 保温饲养 (剩余玉米叶片放入培养皿内, 置 4℃ 冰箱中待换用)。处理后连续饲喂三天, 记录存活和死亡虫数, 计算死亡率。对照用 0.1% 洗衣粉水浸过的玉米叶。重复两次。

## 结 果

### (一) 在虫尸中芽孢、晶体形成情况

所有试验菌株在第一次传代的粘虫虫尸内都能形成芽孢和晶体, 体液呈乳白色。从杀死幼虫后培养算起, 芽孢、晶体形成的时间一般为 72 小时, 一些菌株较快, 如 E013 株, IIA29 株, IIAW1 株 48 小时就大量形成芽孢、晶体。IIA9 株最慢,

到 96 小时才大量形成。在虫尸中传代 5—6 次基本上保持原菌株在普通肉汤琼脂上的生长特点。如, IIA9 株芽孢形成慢, 晶体细碎; IHW1 株, IIA29 株和 E013 株芽孢、晶体形成较快并整齐, 科 010 株晶体比其他菌株大。但在第 10 次传代时发现 IIA29 株在虫尸内只形成芽孢不产生晶体。其后, 其他菌株也在第 11—14 代相继不产生晶体(见表 1), 即使转入普通肉汤琼脂上培养也没有看到再产生晶体。

在不产生晶体之前的几代已发现一些菌株的晶体大小发生变化, 如 C<sub>1</sub> 株在 6—7 代时, 晶体变大而且整齐(但在 8—9 代之后晶体又变小了)。又如 IIA9 株在第 9 代时晶体由细碎变得大而整齐, 科 010 在 8—9 代时晶体变小, 随后变为不产生晶体。E013 在 11 代时晶体较大, 但用这一代的菌继续传代或进行平板分离均看不到晶体再产生。

IHW1 在 13 代不产生晶体之后, 继续再传到 16 代仍只产生芽孢不产生晶体。

表 1 苏云金杆菌的一些菌株连续通过粘虫虫体传代后晶体产生情况\*

菌 株	…第 9 代	第 10 代	第 11 代	第 12 代	第 13 代	第 14 代	第 15 代	第 16 代
科 010	……S+C+	S+C+	S+C-					
C <sub>1</sub>	……S+C+	S+C+	S+C+	S+C+	S+C+	S+C-		
E013	……S+C+	S+C+	S+C+	S+C-				
IIA9	……S+C+	S+C+	S+C+	S+C+	S+C+	S+C-		
IIA29	……S+C+	S+C-						
IHW1	……S+C+	S+C+	S+C+	S+C+	S+C-	S+C-	S+C-	S+C-

\* S+C+ 为产生芽孢、晶体; S+C- 为只产生芽孢不产生晶体。

(二) 对粘虫毒力测定结果

前已述及, 进行粘虫虫体传代的目的是想得到对粘虫毒力强的菌株。因此, 挑取晶体发生了变化的虫尸, 将其中的菌液进行平板分离培养, 4℃保存。对这些菌株连同原株一起进行了毒力测定。发现其中的二个菌株——IIA9<sub>(九)</sub> 株(从

IIA9 第 9 次传代的虫尸中分离的菌株)和 C<sub>1</sub> 株(从美国 Dipel 粉剂分离的培养物)毒力较高。每毫升 1.5—2.0 亿芽孢浓度处理三天后对 4 龄第一天幼虫的死亡率分别为 97.5%和 100%。其他菌株毒力不理想或全无毒力。表 2 列出经过传代和未经传代的一些菌株的测定结果。IIA9<sub>(九)</sub> 的

表 2 经虫体传代和未经虫体传代的一些菌株对粘虫的毒力测定结果\*

试验菌株	试验次数	试验虫数	死 亡 虫 数			总死亡 虫数	死亡率 (%)
			24小时	48小时	72小时		
E013	—	40	6	9	4	19	47.5
	二	40	0	3	7	10	25
IIA9	—	40	0	0	0	0	0
	二	40	0	0	0	0	0
IIA9 <sub>(九)</sub>	—	40	12	21	6	39	97.5
	二	40	9	23	7	39	97.5
IHW1 <sub>(十六)</sub>	—	40	0	0	0	0	0
	二	40	0	0	0	0	0
C <sub>1</sub>	—	40	15	22	3	40	100
	二	40	14	24	2	40	100
对 照	—	40	0	0	0	0	0
	二	40	0	0	0	0	0

\* E013 和 IIA9 为未经传代菌株;  
IIA9<sub>(九)</sub>为从 IIA9 第 9 次传代的虫尸中分离的菌株;  
IHW1<sub>(十六)</sub> 为从 IHW1 第 16 次传代的虫尸中分离的菌株;  
C<sub>1</sub> 为从美国 Dipel 粉剂分离的培养物, 未经传代。

原株为 II A<sub>9</sub>, II A<sub>9</sub> 是从 E013 得来的。从表 2 可以看到 II A<sub>9</sub> 全无毒力, E013 毒力也不高(一次为 47.5%, 另一次为 25%)。

随后我们用 II A<sub>9</sub>(<sub>九</sub>), C<sub>1</sub> 和 E013 这三个菌株反复进行了多次室内测定。II A<sub>9</sub>(<sub>九</sub>), C<sub>1</sub> 都保持一致的效果, E013 较有波动, 但毒效均不高。

表 3 II A<sub>9</sub>(<sub>九</sub>), E013 和 C<sub>1</sub> 三个菌株的野外试验结果\*

菌 株	喷菌前每平方 米虫数	喷菌后总虫数			虫口下降 率(%)
		24小时	48小时	72小时	
II A <sub>9</sub> ( <sub>九</sub> )	49	30	23	17	65.3
E013	67	80	72	58	13.4
C <sub>1</sub>	70	59	23	25	63.7
对照	49	47	32	42	14.2

\* II A<sub>9</sub>(<sub>九</sub>), E013 和 C<sub>1</sub> 均由武汉微生物农药厂生产。

试验地为北京市平谷县南独乐河大队谷子地, 以 4 分地为一区, 每区喷 2 亿芽孢/毫升菌悬液 (0.1% 洗衣粉) 20 斤。

## 讨 论

Smirnoff 等 (1961) 曾指出腊状芽孢杆菌群 (*Bacillus cereus* group) 的细菌一般在昆虫虫尸内不易形成芽孢。站沢等 (1962) 用美国商品制剂 Agritol 的分离培养物对在蚕尸内的芽孢形成进行的研究也得到同样的结果。但随后站沢等 (1964) 又报告用 *B. s.* T84A 株试验时得到不同的结果, 即 T84A 株在蚕尸内比较容易形成芽孢和晶体。并且认为试验结果不同可能是由于菌株不同的缘故。

我们用 *B. s.* 的 6 个菌株连续通过粘虫虫体进行传代试验, 在第 9 代之前的虫尸内都可以看到芽孢晶体形成, 但是第 10—14 代时, 所有菌株在虫尸内均相继不形成晶体只形成芽孢。这个结果同 Toumanoff 等在培养基上连续传代的结果很相似。Toumanoff 等将 *B. s.* 在碱性培养基 (pH9—9.5) 上连续传代之后, 发现晶体产生能力消失 (见刘崇乐等, 1962), 而粘虫消化道液体的 pH 也为碱性 (pH8.5—9)。

1977 年 8 月, 在北京市平谷县用这三个菌株进行了一次野外试验, 试验结果见表 3。II A<sub>9</sub>(<sub>九</sub>) 和 C<sub>1</sub> 对粘虫仍有相当效果, 但不如实验室内效果好。

显微镜检查 II A<sub>9</sub>(<sub>九</sub>) 和 C<sub>1</sub> 这两个毒力较高的菌株, 可以看到前者晶体大而整齐, 后者则不甚整齐, 大晶体比例不高。

现已知道, *B. s.* 的杀虫效果主要是由于细菌产生的各种毒素——特别是晶体毒素作用的结果。但是, 正如站沢等 (1976) 所指出: 晶体毒素不一定是稳定的, 如果一旦消失之后便不会再恢复形成, 而且变得对昆虫无毒。我们的试验结果也说明了这一点。II W1 在传到第 13 代时, 晶体消失了, 即使继续传代也没有看到晶体再形成。用经过 16 次传代后分离的不形成晶体的细菌进行试虫, 完全没有毒力。

晶体的大小与毒力的关系, 是一个引起重视的问题。II A<sub>9</sub>(<sub>九</sub>) 株和 C<sub>1</sub> 株对粘虫的毒力差不多。但两者的晶体大小并不相同。前者的晶体比起所有传代的菌株都大, 后者则大小不齐, 小晶体的比例还很高。所以, 关于这两个菌株的致病机制需要进一步探讨。

*B. s.* 在虫尸中只形成芽孢不形成晶体的现象, Prasertphon 等 (1973) 也曾观察到。因此用这个方法进行“虫体复壮”时需要注意。我们认为通过虫体传代注意观察、及时分离是可能筛选出毒力较高的菌株的。

### 参 考 文 献

- 史泰奥斯, E. A. (忻介六等译) 1956 昆虫病理学原理(上册)第 235 页 科学出版社。
- 吉川直宏ら 1974 日本应用动物昆虫学会大会讲演要旨 第18回 第 413 页。
- 盛祖嘉 1974 微生物学通报 4: 34—8。
- Smirnoff, W. A. et al. 1961 J. Inverteb. Pathol. 3:

403—8。

- 鮎沢啓夫ら 1962 日本蚕丝学杂志 31: 253—7。
- 鮎沢啓夫ら 1964 日本蚕丝学杂志 33: 399—401。
- 刘崇乐等 1962 苏云金杆菌研究的五十年 第 10 页 科学出版社。
- 昆虫病理组 1973 昆虫学报 16: 91—3。
- 鮎沢啓夫ら 1976 化学と生物 14: 214—21。
- Prasertphon, S. et al. 1973 J. Invert. Pathol. 21: 205—7。

## EFFECT OF SUCCESSIVE CULTIVATION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* IN ARMYWORM UPON CRYSTAL FORMATION

SHING SHING-ZHU XIE QIANG-JIANG YANG MING-HUA

(Institute of Zoology Academia Sinica, Peking)